



Please Click here to view the drawing

Korean FullDoc.

(19)

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11) Publication number: 1020020082239 A
(43) Date of publication of application: 31.10.2002

(21) Application number: 1020010021064

(71) Applicant:

KIM, HYUN SOO
LIFECORD INC.

(22) Date of filing: 19.04.2001

(72) Inventor:

KIM, HYUN SOO
YOON, HUI HUN

(51) Int. Cl

C12N 5 /08

(54) METHOD FOR DIFFERENTIATING A MESENCHYMAL STEM CELL INTO NEURAL CELLS

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a method for differentiating a mesenchymal stem cell into neural cells by culturing the mesenchymal stem cell in a medium containing epidermal growth factor(EGF) and hepatocyte growth factor(HGF). The neural cells are used for cell replacement therapy and drug development. CONSTITUTION: The method for differentiating a mesenchymal stem cell into neural cells is characterized by culturing the mesenchymal stem cell in a medium containing 5–50 ng/ml of epidermal growth factor and 10–100 ng/ml of hepatocyte growth factor for 4–8 weeks, wherein the mesenchymal stem cell is obtained from human bone marrow and the neural cell includes neuron or astrocyte. A composition for neurodegenerative disease comprises the neural cell as an active ingredient, wherein the neurodegenerative disease includes picks disease, Huntingtons disease, amyotrophic lateral sclerosis, stroke and etc.

copyright KIPO 2003

Legal Status

Date of request for an examination (20010419)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20040805)

Patent registration number (1004491410000)

Date of registration (20040910)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse (2004101001656)

Date of requesting trial against decision to refuse (20040416)

(19) 대한민국특허청 (KR)
 (12) 공개특허공보 (A)

(51) . Int. Cl. 7
 C12N 5/08

(11) 공개번호 특2002 - 0082239
 (43) 공개일자 2002년 10월 31일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 0021064
 (22) 출원일자 2001년 04월 19일

(71) 출원인 김현수
 경기도 수원시 팔달구 영통동 동신아파트 313 - 1003호
 (주)라이프코드
 서울특별시 강남구 역삼동 834 - 44 신명빌딩 6층

(72) 발명자 김현수
 경기도 수원시 팔달구 영통동 동신아파트 313 - 1003호
 윤희훈
 인천광역시 강화군 하점면 이강2리 408

(74) 대리인 이현실
 장성구

심사청구 : 있음

(54) 간엽 간세포를 신경세포로 분화시키는 방법

요약

본 발명은 골수 유래 간엽 간세포 (mesenchymal stem cell)를 신경세포로 분화시키는 방법 및 상기 골수내의 간엽 간세포로부터 분화되는 신경세포를 유효성분으로 하는 신경 질환 치료용 세포 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 상피 세포 성장 인자 (epidermal growth factor; EGF) 및 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor; HGF)를 포함하는 배지에서 배양함으로써 골수 내의 간엽 간세포를 신경세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 따르면 80% 이상의 세포가 뉴런 또는 성상교세포로 분화하는데, 분화 및 증식된 신경세포는 파킨슨씨병, 알츠하이머 등의 퇴행성 뇌신경 질환과 뇌손상에 의한 운동장애 등을 치료하기 위한 세포 대체 요법에 이용되거나, 신약개발에 있어 약물효과 검정 또는 각종 연구를 위한 재료로 폭넓게 이용될 수 있다.

대표도
 도 3a

색인어
 간엽 간세포 (mesenchymal stem cell), 신경세포, 분화, 상피세포 성장 인자, 간세포 성장 인자

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 상피세포 성장 인자 10 ng/ml과 간세포 성장 인자 20 ng/ml를 배지에 첨가하여 4주 동안 배양한 골수 단핵세포 중 부착세포를 광학현미경으로 관찰한 것이고 ($\times 100$, 이하 동일).

도 2는 상피세포 성장 인자 10 ng/ml과 간세포 성장 인자 20 ng/ml를 포함하는 배지에서 8주 동안 골수 단핵세포를 배양하여 분화 증식시킨 신경세포를 광학현미경으로 관찰한 것이고,

도 3은 도 2의 분화된 신경세포를 분리하여 관찰한 광학현미경 사진으로, (a)는 뉴런을, (b)는 성상교세포를 보여주는 것이고,

도 4는 도 2의 분화된 신경세포를 면역세포화학염색법으로 염색하여 관찰한 사진으로, (a)는 NSE 양성 염색 세포, (b)는 NeuN 양성 염색 세포, (c)는 GFAP 양성 염색세포를 보여주는 사진이고,

도 5는 골수에서 분리한 단핵세포들을 낮은 포도당 농도의 배지에서 배양하여 간엽 간세포만을 분리하고 이들에 각각 시약을 처리하여 골아세포 (a), 연골아세포 (b) 및 지방세포 (c)로 각각 분화시킨 다음 분화된 세포를 염색하여 현미경으로 관찰한 사진이고,

도 6은 상피세포 성장 인자 10 ng/ml과 간세포 성장 인자 20 ng/ml를 포함하는 배지에 접종한 직후의 간엽 간세포의 광학현미경 사진이고,

도 7은 상피세포 성장 인자 10 ng/ml과 간세포 성장 인자 20 ng/ml를 포함하는 배지에서 간엽 간세포를 8주간 배양하여 분화 증식된 신경세포의 광학현미경 사진이고,

도 8은 도 6에서부터 분화된 신경세포를 면역세포화학염색법으로 염색하여 관찰한 사진으로, (a)는 NSE 양성 염색 세포, (b)는 NeuN 양성 염색 세포, (c)는 GFAP 양성 염색세포를 보여주는 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 상피세포 성장 인자 및 간세포 성장 인자를 포함하는 배지에서 배양함으로써 골수 내에 존재하는 간엽 간세포를 신경세포로 분화시키는 방법 및 상기 골수 유래 간엽 간세포로부터 분화되는 신경세포를 유효성분으로 하는 신경질환 치료용 세포 조성물에 관한 것이다.

간(幹)세포 (stem cell)란 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 미분화 상태에서 무한 증식이 가능하며 특정 분화 자극에 의해 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재적 가능성을 가진 세포를 말한다.

간세포는 분화 가능성에 따라 크게 배아 간세포 (embryonic stem cell; ES cell)와 조직 특이적 간세포 (tissue-specific stem cell)로 나뉜다. 배아 간세포는 수정란이 형성된 후 자궁내막에 착상하기 전의 매우 초기 단계인 포배기 (blastocyst) 배아 중 태아로 발생할 세포괴 (inner cell mass; ICM)로부터 분리해낸 간세포로서, 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 3개의 배엽 (embryonic germ layer)에 의해 생성되는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 가지고 있는 (pluripotent) 세포이다.

반면, 조직 특이적 간세포는 배아 발생 과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계에 나타나는, 각 장기에 특이적인 간세포로서, 그 분화능이 일반적으로 그 조직을 구성하는 세포로만 한정되게 (*multipotent*) 된다. 이러한 조직 특이적 간세포는 성인이 된 후에도 대부분의 장기에 남아 정상적으로 혹은 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하는 역할을 한다. 대표적인 조직 특이적 간세포로는 골수 (*bone marrow*)에 존재하는 조혈 간세포 (*hematopoietic stem cell*)와 혈구 세포 이외의 결합조직 (*connective tissue*) 세포로 분화되는 간엽 간세포 (*mesenchymal stem cell*)가 있다. 조혈 간세포는 적혈구, 백혈구 등 각종 혈구 세포로 분화되고, 간엽 간세포는 골아세포 (*osteoblast*), 연골아세포 (*chondroblast*), 지방 세포 (*adipocyte*) 및 근아세포 (*myoblast*) 등으로 분화된다.

최근에는 인간으로부터의 배아 간세포 분리가 성공한 이후, 그 임상적 적용에 관심이 고조되고 있다. 간세포의 적용 분야로서 가장 주목받고 있는 것은 세포 대체 요법 (*cell replacement therapy*)을 위한 완벽한 세포 공급원으로서의 이용이다. 난치병으로 알려진 파킨슨씨병, 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환, 척추 손상에 의한 사지마비, 백혈병, 중풍, 소아당뇨병, 심근경색, 간경화 등의 질환은 조직을 구성하는 세포의 파괴 및 영구적 기능 장애에 의해 초래되는데, 이를 질환에 의해 파괴되어 부족한 세포를 외부로부터 공급해주는 세포 대체 요법이 효과적인 치료법으로 제시되고 있다.

그러나, 세포 대체 요법의 놀라운 효과에도 불구하고, 이를 실제 임상에 적용하는 데에는 많은 한계가 있다. 즉, 분화가 완전히 진행된 세포를 공급자의 조직으로부터 분리하여 환자에게 이식하는 전통적인 방법은 환자에게 공급할 충분한 세포를 얻는데 어려움이 있다. 이러한 세포 공급의 문제를 해결하기 위해 배아 간세포를 분리하여 특정 조직의 세포로 분화시켜 사용하거나, 조직 특이적 간세포를 분리하고 이를 배양하여 증식시킨 다음 분화를 유도하여 세포 대체 요법에 사용할 수 있다.

지금까지 배양접시 상에서 마우스의 배아 간세포로부터 조혈세포, 심근세포, 인슐린 분비 췌장세포 및 신경세포로의 분화가 증명되었다. 또한, 배아 간세포로부터 수초 (*myelin*) 생성 세포인 다수상돌기세포 (*oligodendrocyte*)로 분화를 유도한 후 이를 마우스에 이식하여 수초 생성을 증가시키거나 (Brustle et al., *Science* 285:754 - 756, 1999), 배아 간세포에서 분화된 인슐린 분비 세포를 당뇨병 모델 쥐에 이식하여 혈당량을 조절하거나 (Soria et al., *Diabetes* 49 :157 - 162, 2000), 배아 간세포에서 분화된 신경세포를 척추 손상을 입은 쥐에 이식하여 척추 손상에 의한 운동장애의 현저한 개선을 확인한 연구 (McDonald et al., *Nat. Med.* 5(12):1410 - 1412, 1999) 등은 간세포로부터 분화 증식시킨 세포를 이식하는 방법이 세포의 손실에 의한 질병의 치료에 효과적임을 보여주고 있다.

그러나, 인간 배아 간세포의 분리가 성공한 것은 최근의 일이며, 신경세포로의 분화 외에는 배양접시 상에서 다른 특정한 세포로의 분화에 성공한 보고가 없는 실정이어서 세포 대체 요법에 배아 간세포로부터 분화된 특정 조직 세포를 임상 적용하는 것은 아직 가능성의 수준에 머물러 있을 뿐이다.

이처럼 배아 간세포로부터 분화된 세포를 세포 대체 요법에 이용하는 것이 현재로서는 가장 효과적인 방법인 것으로 여겨지지만, 배아 간세포로부터 필요로 하는 특정 세포로 분화되는 효율이 낮기 때문에 환자에게 이식 할 경우 혼합된 다른 세포로 인한 부작용의 위험성이 있어, 보다 안전한 임상 적용을 위해서는 정교한 분화발생법에 대한 연구가 요구되고 있다.

한편, 세포 대체 요법을 위해 조직 특이적인 간세포를 이용하는 경우에 있어서는, 장기간 배양시 세포 증식 능력이 감소하거나 분화 잠재력이 변형되어 원치 않는 세포로의 분화가 일어나기도 하는 등의 문제가 있다. 더욱이 파킨슨씨병과 같은 퇴행성 뇌신경 질환 (*neurodegenerative disease*)의 경우 신경세포의 이식이 필요한데, 신경 간세포 (*neural stem cell*)를 환자로부터 직접 얻는 것이 어렵기 때문에 이식에 필요한 신경세포는 주로 태아의 뇌조직으로부터 분리한

신경 간세포를 배양하여 신경 세포로 분화 및 증식시킴으로써 얻어진다. 이 때 한 사람의 환자를 치료하기 위해서는 대략 두 명 정도의 태아의 뇌가 필요하므로, 윤리적인 문제 및 원활한 공급에 있어 문제가 있을 뿐만 아니라 대부분의 신경 간세포가 신경 세포로 분화되기보다는 성상교세포 (astrocyte)로 분화되기 쉽고, 면역 거부 반응을 일으키는 등의 문제점이 있다.

따라서, 골수에 존재하는 간엽 간세포로부터 신경 세포를 분화시켜 사용할 수 있다면 세포 공급 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 자가 골수를 이용하므로 면역 거부 반응을 포함한 치료상의 문제점도 해결할 수 있는 이점을 갖는다.

이전까지 한 종류의 간세포는 특정 계통에 속하는 조직 세포들만으로 분화되는 것으로 여겨져 왔다. 간엽 간세포의 경우에는, 혈청과 혈소판 유래 성장인자 (platelet - derived growth factor), 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic fibr oblast growth factor), TGF - β (transforming growth factor - β) 또는 EGF 등을 포함한 여러 가지 성장인자들의 존재 하에서 생체외 군집 (in vitro colonies)을 형성할 수 있으며 (Kuznetsov et al., Br. J. Haematol. 97:561, 1997; van den Bos C et al., Human Cell 10:45, 1997), 대략 초기 부착 세포의 1/3 정도가 다분화능력을 지니고 있어 골아세포, 연골아세포, 지방세포 등의 결합조직 세포로 분화할 수 있다고 보고되어 있다 (Pittenger MF et al., Science 284:143, 1999). 또한, 폐라리 등은 골수가 새로운 근육을 형성할 수 있는 근형성 전구세포 (myogenic precursor cell)의 원천이라고 보고하였다 (Ferrari G et al., Science 279:1528, 1998).

그러나, 최근 일련의 연구들은 이처럼 결합조직으로만 분화되는 것으로 여겨져 왔던 간엽 간세포가 신경 계통 세포들로 분화될 수 있음을 보고하고 있다. 예를 들어 산체스 등 (Sanchez - Ramos et al., Exp. Neurology 164:247 - 256, 2000)은 레티논산 (retinoic acid)과 BDNF (brain - derived neurotrophic factor)을 첨가하여 배양하였을 때 골수 간엽 간세포로부터 신경세포 및 성상교세포가 분화됨을 보고하고 있고, 데일 우드베리 등 (Dale Woodbury et al., J. Neuro. Res. 61:364 - 370, 2000)은 β - 머캅토에탄올 (β - mercaptoethanol) 또는 DMSO (dimethyl sulfoxide)와 같은 항산화 물질이 골수 간엽 간세포를 신경세포로 분화시킬 수 있음을 보고한 바 있다. 그러나, DMSO와 같이 강력한 분화 유도제를 사용할 경우 임상시험 등에 많은 제약이 따르게 된다.

이에 본 발명자들은 인체에 존재하여 안전성이 높으면서도, 효과적으로 골수 내에 존재하는 간세포를 신경세포로 분화시키는 물질을 탐색한 결과, 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor; HGF)가 골수 간엽 간세포로부터 신경세포의 분화를 촉진할 수 있으며, 상기 간세포 성장 인자와 함께 상피세포 성장 인자 (epidermal growth factor; EGF)를 배양배지에 첨가하면 높은 비율로 신경세포로 분화되고 그 증식도 활발하다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명의 목적은 골수내 단핵세포, 보다 상세하게는 골수 간엽 간세포로부터 신경세포로의 분화 및 증식을 유도하는 물질을 제공하는 것이다.

아울러 본 발명의 또 다른 목적은 상기 목적에 적합한 신경세포 분화용 배지 조성물 및 이를 이용하여 골수 내의 간엽 간세포 또는 단핵세포로부터 신경세포를 증식 분화시키는 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 골수 간엽 간세포 또는 골수 내 단핵세포로부터 분화된 신경세포를 유효성분으로 하는 신경 질환 치료용 세포 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상피세포 성장 인자 및 간세포 성장 인자를 동시에 처리하여 간엽 간세포를 신경세포로 분화 및 증식시키는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명의 방법에 의해 간엽 간세포로부터 분화되는 신경세포 및 상기 신경세포를 유효성분으로 하는 신경질환 치료용 세포조성물을 제공한다.

상기에서, 간엽 간세포를 신경세포로 분화시키는 방법은 상피세포 성장 인자 5~50 ng/ml, 간세포 성장 인자 10~100 ng/ml을 포함하는 배지에서 4주 이상 배양하는 방법이 바람직하다. 특히 배양 4주 후에는 몇 개의 세포로 구성된 신경세포 집단이 형성되며, 약 8주 후에는 상기 신경세포 집단이 계속적으로 성장 증식하여 신경세포를 대량으로 얻을 수 있다.

또한, 상기와 같이 상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 동시에 포함하는 배지에서 약 8주간 배양하여 완전히 분화 증식시킨 후에는 상피세포 성장 인자만을 처리하여도 신경세포의 특성을 그대로 유지하면서 계속적으로 증식한다. 이와는 달리 약 8주간의 배양으로 충분히 분화 증식된 신경세포에 간세포 성장 인자만을 계속 처리하면 오히려 분화만이 진행되어 오히려 세포수가 감소하므로, 약 8주의 분화기간 이후에는 상피세포 성장 인자만을 포함하는 배지로 교환하여 계속 증식시키는 것이 바람직하다.

상기에서 간엽 간세포는 바람직하게는 인간의 골수로부터 분리하여 사용할 수 있는데, 골수에서 단핵세포를 분리한 후 이를 1 내지 2주간 배양하면 분화되기 쉬운 조혈 간세포는 모두 분화되어 성숙한 혈구 세포들을 만들기 때문에 남아 있는 무한 증식 세포인 간세포만을 분리하는 방법에 의해서 손쉽게 간엽 간세포만을 얻을 수 있다. 아울러, 골수에서 분리한 단핵세포에서 간엽 간세포를 분리해내지 않고, 간엽 간세포를 포함하는 단핵세포들 전체를 본 발명의 방법에 따라 배양하여도 신경세포의 대량 생산이라는 동일한 효과를 얻을 수 있다.

상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 동시에 사용하여 간엽 간세포로부터 분화 증식시키는 본 발명의 방법에 의해, 총 세포의 약 80% 이상이 신경세포로 분화되는데, 분화된 신경세포 중 대략 70% 정도는 뉴런, 약 30%는 성상교세포로 구성되며, 미세신경교세포로는 분화되지 않는다.

본 발명에서 '신경세포'라 함은 뉴런 (neuron), 성상교세포 (astrocyte) 및 미세신경교세포 (microglial cell)를 포함하는 세포들을 의미한다.

한편, 본 발명의 방법으로 생산되는, 간엽 간세포로부터 분화된 신경세포는 신경 질환 등을 치료하기 위한 세포 대체 요법용 세포 조성물의 유효 성분으로 이용될 수 있다. 본 발명의 방법으로 생산된 신경세포를 이용하여 치료할 수 있는 신경 질환으로는 파킨슨씨병, 알츠하이머, 피크병 (Pick's disease), 헌팅تون병 (Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis) 및 허혈성 뇌질환 (ischemic brain disease; stroke)과 같은 퇴행성 뇌신경 질환이 대표적이지만 이에 한정되는 것은 아니며, 신경세포의 비정상적 소멸에 의해 야기되는 각종 질병은 물론 척수 손상에 의한 운동 장애 등의 치료에도 이용될 수 있다.

본 발명의 방법에 의해 생산된 신경세포를 유효성분으로 하는 치료용 조성물은 공지의 방법에 따라 환자의 생체 내로 주입될 수 있는데, 예를 들어 더글拉斯 콘치올카 (Douglas Kondziolka, Pittsburgh, 1998)가 발표한 임상 방법을 이용할 수 있다. 즉, 먼저 환자의 두개골을 약 지름 1cm 정도의 완두콩 크기로 절개한 다음, HBSS (Hank's balanced salt solution)와 혼합된 신경 세포 용액을 3군데 정도로 주입하는 방법이 이용될 수 있다. 이때 세포용액의 주입은 긴 바늘이 달려 있는 주사기와, 뇌심부에 목적하는 세포 용액을 정좌표로 삽입하기 위한 틀 (stereotactic frame)을 이용하여 이루어진다.

상기 신경세포의 1회 투여량은 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 세포수인 것이 바람직하며, 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여 경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자를 고려하여 증감이 가능하다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명에서 사용되는 상피세포 성장 인자와 염기성 섬유아세포 성장 인자를 뇌조직으로부터 분리된 신경 간세포 (neuronal stem cell)를 배양하는 무혈청 배지에 첨가하면, 신경 간세포가 뉴런 또는 성상교세포로 분화되도록 자극하는 것으로 알려져 있다 (Melissa et al., Exp. Neurology 158:265 - 278, 1999).

간세포 성장 인자는 4개의 크링글 (kringle)을 갖는 α 사슬과 세린 - 프로테아제와 유사한 β 사슬로 구성되는 이종 이량체 (heterodimer)로서, c-Met와 함께 뇌조직 전체에서 발현된다 (Jung W et al., J. Cell Biol. 126:485 - 494, 1994). 간세포 성장 인자는 해마와 중뇌 뉴런의 생존을 향상시키며 신피질 외식 (neocortical explant)에서 신경돌기 (neurite)의 성장을 초래한다 (Hamanoue M et al., J. Neurosci. Res. 43:554 - 564, 1996). 또한, 말초 신경계에서 간세포 성장 인자는 운동성 뉴런의 생존 인자로 기능하며 (Ebens A et al., Neuron 17:1157 - 1172, 1996), 감각 뉴런과 부교감신경 뉴런의 성장과 생존에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Fleur Davey et al., Mol. Cell Neurosci. 15:79 - 87, 2000).

그러나, 상기 상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 동시에 사용하여 간엽 간세포로부터 신경세포를 분화 증식시킬 수 있다는 사실은 본 발명에 의해 최초로 밝혀진 것으로, 기존에는 DMSO와 같은 강력 분화제를 이용한 간엽 간세포에서 신경세포로의 분화에 대해서만 알려져 있었다. 따라서, 인간 생체 내에 존재하는 단백질 자체를 이용하는 본 발명의 방법은 그 안전성 면에서 특히 바람직하다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는, 골수로부터 단핵세포만을 분리하여 이들에 대해 상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 동시에 처리한 경우와, 이들을 각각 처리한 경우의 신경세포로의 분화 및 증식 정도를 조사하였다. 그 결과, 상기 인자들을 동시에 처리한 경우에는 약 4주 후 신경세포 집단들이 나타나기 시작하여 8주 후까지 계속 증식하였지만, 상피세포 성장 인자만을 처리한 경우에는 신경세포로 분화하지 못하였고, 간세포 성장 인자만을 처리한 경우에는 세포가 일찍 분화되어 성장 증식하지 못하였다. 따라서, 간엽 간세포 또는 이를 포함하는 골수 유래 단핵세포들을 배양하여 신경세포로 분화 증식시킴에 있어, 상피세포 성장 인자는 주로 세포의 증식 자극 효과를, 간세포 성장 인자는 신경세포로의 분화를 자극하는 효과를 나타내는 것으로 판단되며, 이들 인자들 중 어느 하나만에 의해서는 목적하는 충분한 양의 신경세포를 얻을 수 없음을 알 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시예에서, 상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 첨가하여 8주 동안 배양한 후 분화 증식된 세포들을 단일세포로 분리하여 광학현미경으로 관찰한 결과, 축색과 같은 긴 돌기와 신경돌기와 같은 짧은 돌기들로 구성된 뉴런과 짧은 신경돌기만으로 구성된 성상교세포들로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다.

또한, 본 발명의 또 다른 실시예에서 상기 분화 증식된 세포들에 대해 면역세포화학 염색을 수행한 결과, 뉴런 표지인 NSE 및 NeuN과 성상교세포 표지인 GFAP에 대해 양성으로 염색되는 것으로 나타나 상기 세포들이 뉴런 및 성상교세포로 구성되어 있음을 보다 확실히 알 수 있었다. 한편, 미세신경교세포 표지인 OX-42에는 음성 반응을 보여 미세신경교세포로는 분화하지 않음을 알 수 있다.

한편, 상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 동시에 처리하였을 때, 약 8주 후에는 약 80% 정도가 신경세포로 분화하였으며, 이 중 뉴런이 약 70%, 성상교세포가 약 30%를 차지하였다. 약 8주 후 신경세포로의 분화 및 증식이 충분히 일어난 후부터는 상피세포 성장 인자만을 처리하여도 신경세포 형태를 그대로 유지한 채 연속적으로 증식하였다. 그러나, 간세포 성장 인자만을 처리한 경우에는 분화만 진행되어 계속 증식하지 못했다.

이상과 같이 상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 이용하여 골수 내 단핵세포로부터 분화되는 신경세포가 간엽 간세포로부터 분화되는 것인지 확인하기 위하여 상기 단핵세포들 중 간엽 간세포만을 분리하였다. 골수 유래 단핵세포들 중에는 조혈 간세포와 간엽 간세포의 두 가지 종류의 간세포가 존재하는데, 조혈 간세포는 일반적인 배양 조건 하에서

쉽게 혈구 세포들로 분화되어 버리므로 약 1 내지 2주간 배양한 후 계속적인 증식이 가능한 것으로 나타나는 간세포는 간엽 간세포이다. 이와 같은 방법으로 20회 이상 계대 배양할 수 있는 간엽 간세포만을 분리한 뒤, 다양한 결합 조직 세포로의 분화능을 가진 간엽 간세포임을 확인하기 위하여 다양한 결합 조직으로의 분화 실험을 수행하였다. 그 결과, 골아세포, 연골아세포, 지방세포로의 분화능을 가진 간엽 간세포임을 확인하였다.

본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 분리된 간엽 간세포에 대해 골수 유래 단핵세포의 경우와 마찬가지로 신경세포로의 분화 및 증식 실험, 광학현미경 관찰, 면역세포화학 염색 등을 통해, 상피세포 성장 인자 및 간세포 성장 인자에 의해 간엽 간세포가 효과적으로 뉴런과 성상교세포로 분화되고 계속적으로 증식함을 확인하였다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1> 골수 내 단핵세포 (mononuclear cells)의 분리

먼저 병력이 없는 정상 지원자들을 대상으로 골반 (pelvis)으로부터 골수 약 10 ml 정도를 채취하여 헤파린이 함유된 유리관으로 옮겨 저장하였다. 10 ml의 골수에 30 ml의 인산 완충 식염수 (phosphate buffered saline; PBS)를 첨가하고, 혼합용액 20 ml를 10 ml의 Ficoll - Paque TM plus (1.077 g/ml, Amersham Pharmacia Biotech) 용액 위로 천천히 흘려보낸 후 2000 rpm으로 20 분간 밀도 구배 원심분리 (density gradient centrifugation) 하였다. 다음 맨 위층과 Ficoll - Paque TM plus 계면에 있는 단핵세포 층을 회수하고 다시 1800 rpm으로 5 분간 원심분리를 하여 단핵세포만을 회수하였다.

< 실시예 2> 단핵세포 배양

실시예 1에서 얻어진 단핵세포를 1×10^6 cells/cm²로 배양 플라스크에 접종하고, 4시간 후 새로운 기초 배지로 세척하여 비부착 세포를 제거하였다. 상기에서 기초 배지로는 3.5 μM의 하이드로코르티손 (hydrocortisone, Sigma), 지방산이 제거된 우혈청 알부민 (fatty acid free bovine serum albumin, Gibco BRL)과 동일 물 비로 혼합된 50 ng/mI의 리놀렌산 (linoleic acid, Sigma Co.), CuSO₄ · 5H₂O (0.1 μM, Sigma), ZnSO₄ · 7H₂O (50 pM, Sigma), H₂SeO₃ (3 ng/ml, Sigma), NaHCO₃ (1.05 mg/ml, Sigma Co.), HEPES (1.19 mg/ml, Sigma), 페니실린 (100 U/ml, Gibco BRL), 스트렙토마이신 (10 mg/ml, Gibco BRL), 암포테리신 (25 μg/ml, Gibco BRL)을 포함하는 윌리암 E 배지 (Williams' E medium, Gibco BRL)를 사용하였다.

< 실시예 3> 단핵세포의 신경세포로의 분화

기초 배지에 상피세포 성장 인자 (Gibco BRL) 10 ng/ml과 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor, R & D Systems) 20 ng/ml를 첨가한 분화 배지를 이용하여 실시예 2의 단핵세포가 신경세포로 분화되는지 확인하였다. 이 때 분화 배지는 일주일에 두 번씩 교체하며 배양하였다.

상기 분화 배지를 이용하여 단핵세포를 배양하면 약 4주 후 신경세포 집단 (neural cell colonies)이 나타나기 시작하여 계속 증식해 나갔다 (표 1, 도 1). 그리고 분화 배지에서 배양한지 약 8주 후엔, 축색 (axon)과 같은 긴 돌기와 신경돌기 (dendrite)와 같은 짧은 돌기들로 구성된 신경세포 (neuron)와 짧은 신경돌기들로만 구성된 성상교세포 (astrocyte)의 형태를 지닌 세포들만이 관찰되었다 (도 2 및 도 3a, 3b). 또한, 8주 후부터는 상피세포 성장 인자로만 처리하여도 형태는 그대로 유지한 채 증식함을 확인하였다.

그러나, 상기와 같이 EGF와 HGF를 병용처리한 경우와는 달리, EGF만 처리한 경우에는 신경세포로 분화하지 못하였고, HGF만 처리한 경우에는 세포가 일찍 분화되어 성장 증식하지 못했다.

[표 1]

초기 접종 단핵세포수	성장인자로 처리하지 않음	HGF만 처리	EGF만 처리	EGF와 HGF로 병용처리
7.5×10^7	증식 않함	증식 않함	1×10^5	2×10^5

[표 2] 8주 동안 EGF와 HGF로 전처리된 세포를 다시 각 성장인자로 4주 및 8주 처리 후 세포의 증식 거동 (초기 접종 세포수는 1×10^5)

	성장인자로 처리하지 않음	HGF만 처리	EGF만 처리	EGF와 HGF로 병용처리
4주 후	증식 않함	증식 않함	2×10^5	2×10^5
8주 후	증식 않함	증식 않함	5×10^5	1×10^5

< 실시예 4> 세포면역화학 염색 (immunocytochemistry)

상기 실시예 3에서 분화된 세포를 1cm^2 의 커버 글래스 위에 $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 로 부착시켰다. 다음 0.1M 인산완충액 (phosphate buffer)으로 5분간 세척한 후 4% 파라포름알데히드를 포함하는 0.1M 인산완충액으로 15분간 고정시키고, 0.1M 인산완충식염수 (phosphate buffered saline; PBS)로 5분간 두 번 세척하였다. 이후 1% BSA와 0.2% Triton X-100이 들어있는 0.1M PBS로 5분간 처리한 후 일차 항체를 첨가하여 16시간 동안 반응시켰다. 상기 일차 항체로는 항 - 인간 NSE (neuron-specific enolase; Chemicon Inc.), 항 - 인간 NeuN (Chemicon Inc.), 항 - 인간 β -튜불린 III (Sigma Co.) 및 항 - 인간 GFAP (glial fibrillary acidic protein; Sigma Co.) 항체를 사용하였다. 일차 항체와의 반응이 종료된 후 반응에 참여하지 않은 일차 항체를 제거하고 0.5% BSA가 포함된 0.1M PBS로 15분간 두 번 세척하였다. 이차 항체를 넣고 30분간 배양한 다음 0.5% BSA가 포함된 0.1M PBS로 5분간 두 번 세척하였다. 이후 아비딘 - 바이오틴 (avidin-biotin)이 들어있는 키트 (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratory Inc.)를 이용하여 30분간 반응을 수행하였다. 0.1M 인산완충액으로 5분간 두 번 세척한 다음 발색 기질로서 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate, Sigma Co.)을 넣어 5분간 반응시켰다. 0.1M 인산완충액으로 5분간 처리하여 반응을 중지시키고 상기 완충액으로 5분간 두 번 세척하였다. 반응물을 건조시킨 후 증류수로 5분간 세척하였다. 이후 증류수, 70, 80, 95 및 100% 에탄올을 이용하여 차례로 탈수시키고, 고정하였다.

세포면역화학 염색 결과, 도 4a, 4b 및 4c에서 보는 바와 같이, 골수 단핵세포로부터 EGF와 HGF를 이용하여 분화시킨 세포들은 신경세포 표지인 NeuN, NSE 및 β -튜불린 III와 성상교세포 표지인 GFAP에 대해 양성으로 염색되는 것으로 보아 형태학적 특징 뿐만 아니라 생화학적으로도 신경세포와 성상교세포의 두 가지 세포로 모두 분화되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 미세신경교세포 표지 (microglia marker)인 OX-42에는 음성적으로 염색되어 미세신경교세포로는 분화하지 않았음을 알 수 있었다.

상기 골수 내 단핵세포들을 EGF 단독으로, 혹은 EGF 및 HGF로 병용처리하여 8주간 배양한 후 NSE와 NeuN에 양성적으로 염색되는 세포인 신경세포 (neuron)와 GFAP에 양성으로 염색되는 성상교세포의 비율을 조사하여 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

	NSE	NeuN	GFAP	음성 세포
EGF 단독 처리	약 0.9%	약 0.8%	약 1.2%	약 89%
EGF + HGF 처리	약 56%	약 75%	약 24%	약 20%

상기 표 3의 결과로부터 알 수 있듯이, EGF와 HGF를 약 8주간 처리한 경우 전체 세포의 약 80%가 신경세포로 분화하였으며, 분화된 신경세포 중 약 70%는 뉴런, 약 30%는 성상교세포인 것으로 나타났다.

< 실시예 5> 골수 간엽 간세포 (mesenchymal stem cell)의 분리 및 배양

상기 실시예에서 살펴본 바와 같이, 골수 유래의 단핵세포 중 신경세포로 분화한 것이 간엽 간세포인지 확인하기 위하여, 단핵세포를 배양하여 간엽 간세포만을 분리하여 각종 세포로의 분화능을 조사하였다.

먼저, 10% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된, 낮은 포도당 농도의 DMEM (Gibco BRL) 배지를 배양배지로 하여 상기 실시예 2의 단핵세포를 1×10^6 cells/cm²로 배양 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 CO₂존재 하에 37°C에서 배양하였으며, 배양 후 약 1~2주가 지나면 계대배양이 가능할 정도로 세포가 증식하였는데, 20회 이상 계대배양 하여도 계속 증식되었다.

골수에서 얻어지는 단핵세포군에는 성숙된 백혈구, 림프구, 조골세포, 연골세포, 근육세포, 섬유아세포, 지방세포는 물론 이들 세포로 분화될 수 있는 간(幹)세포가 존재하는데, 조혈 간세포와 간엽 간세포가 그들이다. 적혈구, 백혈구, 림프구와 같은 혈구세포들을 만드는 조혈 간세포는 일반적인 배양 배지에서는 계속하여 증식하지 못하고 모두 성숙된 세포로 분화되어 버리므로, 상기에서 계속하여 증식 배양되는 세포는 간엽 간세포임을 알 수 있다.

이를 보다 확실하게 확인하기 위하여, 상기에서 얻어진 세포에 각종 사이토카인 및 시약들을 처리하여 간엽 간세포의 특성, 즉 골아세포 (osteoblasts), 연골아세포 (chondroblasts) 및 지방세포 (fat cells)와 같은 각종 결합조직 세포로의 분화 가능성을 갖고 있는지를 확인하였다.

먼저, 골아세포로 분화시키기 위해 100mM 덱사메타손 (dexamethasone), 10mM β - 글리세롤 인산염 (β - glycerol phosphate) 및 50nM 아스코르브산 - 2 - 인산염 (ascorbate - 2 - phosphate)과 10% 우태아혈청으로 처리하였다. 또한, 연골아세포로의 분화 가능성을 조사하기 위하여, 배양된 세포를 원심분리하여 펠렛 형태를 만든 다음, 무혈청 상태 하에서 100nM 덱사메타손과 10ng/ml TGF - β 3를 처리하였다. 한편, 지방세포로의 분화는 1 - 메틸 - 3 - 이소부틸 잔틴 (1 - methyl - 3 - isobutylxanthine) 0.5mM, 덱사메타손 1mM, 인슐린 10g/ml 및 인도메타신 (indomethacine) 100nM, 그리고 10% 우태아혈청 (FBS)를 처리하였다 (이상 Pittenger et al., Science 284:143 - 147, 1999).

각각의 세포로 분화되었는지 여부는, 골아세포의 경우 알칼라인 포스파타제 염색법 (alkaline phosphatase staining; Jaiswal et al., J. Cell Biochem. 64(2):295 - 312, 1997)으로, 연골아세포의 경우 2 형 콜라겐은 역전사효소 중합 효소연쇄반응 (type II collagen RT - PCR; Mackay et al., Tissue Eng. 4(4):415 - 428, 1998)으로 확인하였으며 톨루이딘 블루 (toluidine blue)로 염색하였고, 지방세포의 경우 오일 레드 O 염색법 (oil red O staining)으로 확인하였다.

그 결과, 도 5a, 5b 및 5c에 나타난 바와 같이 모두 양성으로 나타나, 생체 외에서 배양 증식된 간엽 간세포가 여전히 골아세포, 연골아세포 및 지방세포와 같은 다양한 결합조직으로 분화될 수 있는 간세포의 특성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

< 실시예 6> 골수 유래 간엽 간세포의 신경세포로의 분화

상기 실시예 5에서 분리된 간엽 간세포가 동일한 조건 하에서 신경세포로 분화될 수 있는지를 확인하기 위해, 10% FBS (fetal bovine serum)을 포함하는 낮은 포도당 농도의 DMEM으로 생체 외에서 (ex vivo) 배양·증식된 골수 간엽 간세포를 실시예 3과 동일한 방법으로 EGF (Gibco BRL) 10 ng/ml과 HGF (R& D Systems) 20 ng/ml를 첨가한 분화 배지에서 8주 동안 배양하였다.

그 결과, 골수 단핵세포로부터 분화된 신경세포의 경우와 마찬가지로 약 4주 후부터 신경세포 집단이 형성되었고, 계속하여 8주까지 지속적으로 성장, 증식하였다 (도 7). 8주 후에는 EGF만을 처리하여도 신경세포로서의 형태를 그대로 유지한 채 계속적으로 증식하였다.

한편, 상기 분화된 세포들에 대해 실시예 4와 동일한 방법으로 면역세포화학 염색법을 수행한 결과, 골수 내 단핵세포에서 유래한 신경세포 검사 결과와 유사하게 면역세포화학적으로 신경세포 표지인 NeuN, NSE, β -튜불린 III와 성상교세포 표지인 GFAP에 양성 염색되는 것으로 나타났다 (도 8a, 8b, 8c). 따라서, 간엽 간세포는 신경세포 (neuron)와 성상교세포 (astrocyte)의 두 가지 세포로 모두 분화된 것으로 확인되었다.

발명의 효과

본 발명의 방법에 따르면, 골수 유래 간엽 간세포 또는 이를 포함하는 단핵세포들을 뉴런 및 성상교세포로 구성되는 신경세포로 효과적으로 분화 및 증식시킬 수 있으므로, 신경 질환의 치료를 위한 세포 치료용 조성물을 제조하기 위한 신경세포를 대량으로 제공할 수 있다. 또한, 세포 내에 존재하는 자연 물질을 이용하여 증식 분화시키므로 안전성 면에서 효과적이고, 실제 임상 적용시에 문제점이 적다. 또한, 환자 자신의 골수로부터 치료에 필요한 신경세포를 충분히 얻을 수 있어 면역 거부 반응 등의 부작용이 적고, 신경세포를 원활하게 공급할 수 있는 장점이 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

상피세포 성장 인자 (epidermal growth factor)와 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor)를 처리하여 간엽 간세포를 신경세포로 분화 증식시키는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 간엽 간세포를 상피세포 성장 인자 5~50 ng/ml 및 간세포 성장 인자 10~100 ng/ml을 포함하는 배지에서 4주 이상 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제2항에 있어서, 4 내지 8주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제2항에 있어서, 상피세포 성장 인자와 간세포 성장 인자를 모두 포함하는 배지에서 8주간 배양한 후 상피세포 성장 인자만을 포함하는 배지로 교체하여 신경세포를 계속적으로 증식시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 간엽 간세포는 인간의 골수로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 간엽 간세포를 포함하는 단핵세포들을 골수로부터 분리하여 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서, 신경세포는 뉴런 (neuron) 또는 성상교세포 (astrocyte)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법으로 생산되는, 간엽 간세포로부터 분화된 신경세포.

청구항 9.

제8항에 있어서, 전체 분화된 세포의 70% 이상이 뉴런이고 나머지 대부분은 성상교세포인 것을 특징으로 하는 신경세포.

청구항 10.

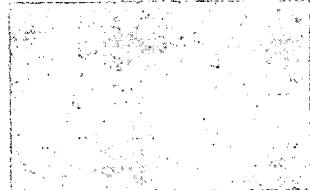
간엽 간세포로부터 분화된 신경세포를 유효성분으로 하는, 신경 질환에 대한 세포 치료용 조성물.

청구항 11.

제10항에 있어서, 신경 질환은 파킨슨씨병, 알츠하이머, 피크병 (Pick's disease), 헌팅تون병 (Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis) 및 허혈성 뇌질환 (stroke)을 포함하는 퇴행성 신경 질환 중 하나이거나 척추손상에 의한 운동 장애인 것을 특징으로 하는, 세포 치료용 조성물.

도면

도면 1



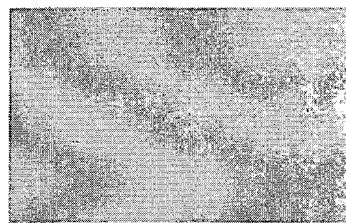
도면 2



도면 3a



도면 3b



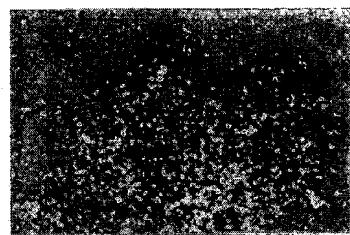
도면 4a



도면 4b



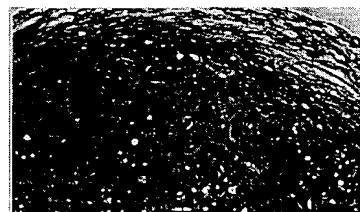
도면 4c



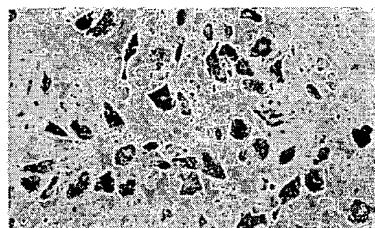
도면 5a



도면 5b



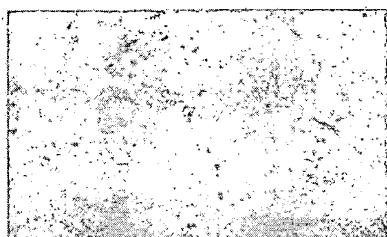
도면 5c



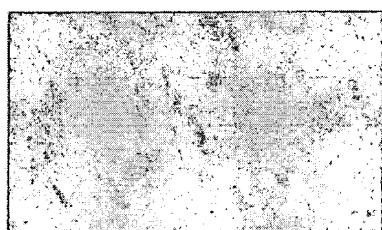
도면 6



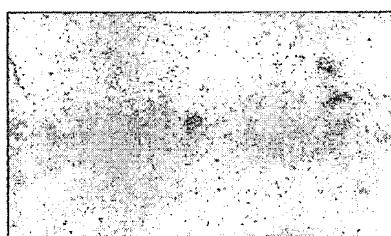
도면 7



도면 8a



도면 8b



도면 8c



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.